



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|-----------|---|
| <p>(51) 国際特許分類7 A61K 35/84, A61P 31/00, 35/00, A23L 1/28, A23K 1/16 // A23L 1/212</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO00/32213</p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月8日(08.06.00)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06617</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月26日(26.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/337822 1998年11月27日(27.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 小林製薬株式会社 (KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-8507 大阪府大阪市中央区道修町4-3-6 Osaka, (JP) 長岡 均(NAGAOKA, Hitoshi)(JP/JP) 〒270-1152 千葉県我孫子市寿2丁目22番13号 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 浅野健治(ASANO, Kenji)(JP/JP) 松田由紀子(MATSUDA, Yukiko)(JP/JP) 〒532-0035 大阪府大阪市淀川区三津屋南3-13-35 小林製薬株式会社内 Osaka, (JP) 田島 裕(TAJIMA, Yutaka)(JP/JP) 〒849-0935 佐賀県佐賀市八戸溝3丁目10番511号 Saga, (JP)</p> | | <p>(74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, GB, KR, SG, US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: $\gamma\delta$T CELL IMMUNOACTIVITY POTENTIATORS CONTAINING SHIITAKE MUSHROOM HYPHA EXTRACT</p> <p>(54)発明の名称 シイタケ菌糸体抽出物を含む $\gamma\delta$ T細胞免疫活性増強剤</p> <p>(57) Abstract $\gamma\delta$T cell activity potentiators and immunoactivity agents containing a shiitake mushroom hypha extract which are to be used in treating tumor or treating and/or preventing bacterial or viral infectious diseases by taking advantage of the effect of the shiitake mushroom hypha extract of remarkably potentiating the activity of $\gamma\delta$T cells.</p> | | |

本発明は、シイタケ菌糸体抽出物が γ δ T 細胞の活性を顕著に増強する作用を有することを利用して、腫瘍の治療若しくは細菌感染症またはウィルス感染症の治療および／または予防に使用するための、シイタケ菌糸体抽出物を含む γ δ T 細胞活性増強物質、ひいては免疫活性剤を開発・提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|-------------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MA | モロッコ | TD | チャド |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BR | ブラジル | GW | ギニア・ビサウ | MG | マダガスカル | TZ | タンザニア |
| BY | ベラルーシ | HR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TM | トルクメニスタン |
| CA | カナダ | HU | ハンガリー | ML | マリ | TR | トルコ |
| CF | 中央アフリカ | ID | インドネシア | MN | モンゴル | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ | IE | アイルランド | MR | モーリタニア | UA | ウクライナ |
| CH | スイス | IL | イスラエル | MW | マラウイ | UG | ウガンダ |
| CI | コートジボアール | IN | インド | MX | メキシコ | US | 米国 |
| CM | カメルーン | IS | アイスランド | NE | ニジェール | UZ | ウズベキスタン |
| CN | 中国 | IT | イタリア | NL | オランダ | VN | ヴェトナム |
| CR | コスタ・リカ | JP | 日本 | NO | ノルウェー | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CY | キプロス | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェコ | KP | 北朝鮮 | PT | ポルトガル | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |
| DK | デンマーク | | | | | | |

明細書

シイタケ菌糸体抽出物を含む $\gamma\delta$ T細胞免疫活性増強剤技術分野

- 5 本発明は、シイタケ菌糸体抽出物を含む、 $\gamma\delta$ T細胞の活性増強剤の開発および提供、ひいては、免疫活性剤の開発および提供に関する。

本発明はさらに、シイタケ菌糸体抽出物を含む、 $\gamma\delta$ T細胞の活性増強作用、ひいては、免疫活性作用を有する食品、飲料および飼料の開発および提供に関する。

- 10 本発明はさらに、シイタケ菌糸体抽出物を含む、抗腫瘍剤、抗細菌感染治療剤および抗ウィルス感染治療剤の開発および提供に関する。

背景技術 $\gamma\delta$ T細胞の特徴

- 15 動物の血液中に存在する末梢T細胞は、その細胞表面抗原であるT細胞受容体(TCR)の種類から、大きく分けて二種類のT細胞が存在することが知られている。1種類は、細胞表面にTCR α 鎖および β 鎖を有する $\alpha\beta$ T細胞であり、もう1種類はTCR γ 鎖および δ 鎖を有する $\gamma\delta$ T細胞である。ヒトにおいては、 $\gamma\delta$ T細胞は、通常の末梢血液およびリンパ組織においては数%~10%程度しか存在しない、
20 $\alpha\beta$ T細胞とは全く異なる特徴を有する傷害キラー細胞である。

$\gamma\delta$ T細胞は、ヒトにおいては腸管、皮膚および末梢血液中等に存在して、局所免疫に働いている。 $\gamma\delta$ T細胞の機能としては、ガン細胞傷害活性、細菌またはウィルスに対する感染防御活性などが現在までに報告されている。

 $\gamma\delta$ T細胞の感染防御活性

- 25 脾臓などに認められる $\gamma\delta$ T細胞の中には、感染の際にIL-4やIFN- α などのサイトカインを産生する細胞が存在する。実験的にこれらの細胞が存在しない状況を作ると、細菌感染に対する抵抗性が減弱することが知られている。たとえば、 $\gamma\delta$ 型TCR抗体を投与して一過性に $\gamma\delta$ T細胞の機能を抑制したマウスやTCR δ 遺伝子欠損マウスにおいて、Mycobacterium tuberculosisの感染に対する抵抗性が

低下したことが報告されている (Ladel C, et al., Eur J Immunol, 1995, 25:2877-2881)。また、Listeria monocytogenes の感染初期において $\gamma \delta$ T 細胞が登場してくることも報告されている (Hiromatsu K, et al., J Exp Med, 1992, 175:49-56)。これらの知見から、 $\gamma \delta$ T 細胞は、細菌感染に対する生体防御において重要な細胞であることが示唆された。

さらに、B 型肝炎ウィルスの慢性感染により、肝臓および脾臓の $\gamma \delta$ T 細胞が増殖誘導されることが報告された (Ozaki S, et al., J Med Invest, 1998, 44:215-217)。また、正常マウスと比較して、 $\gamma \delta$ T 細胞を欠損するマウス体内では、ワクシニアウィルスが感染初期において顕著に増加することも報告されている (Welsh RM, et al., Immunol Rev, 1997, 159:79-93)。これらの知見から、 $\gamma \delta$ T 細胞は、上述した細菌感染症に対する作用のみならず、ウィルス感染に対しても作用していることが示唆された。

$\gamma \delta$ T 細胞のガン細胞傷害活性

$\gamma \delta$ T 細胞は、自己ガン細胞を特異的に殺すことができ、しかも自己の正常リンパ球 (たとえば、 $\alpha \beta$ T 細胞) には全く傷害を示さない T 細胞である。この点で、活性化した $\gamma \delta$ T 細胞を使用してガンの治療をする時には、副作用を生じる危険性が非常に少ないという効果がある。 $\gamma \delta$ T 細胞とは逆に、 $\alpha \beta$ T 細胞は、自己ガン細胞を殺さず、自己白血球を殺すことが知られているため、ガンの治療において $\alpha \beta$ T 細胞を活性化することにより大きな副作用を生じる危険がある。したがって、ガンを治療するためには、活性化した $\gamma \delta$ T 細胞を使用することにより行うことが望ましいと考えられていた。

さらに $\gamma \delta$ T 細胞は、MHC 非拘束性にガン細胞を殺し、NK 細胞と似た性格を有している。 $\gamma \delta$ T 細胞は、小児末梢血液中においては 10% 程度存在するが、加齢とともにその数が減少する。そのため加齢とともにガンが多くなっていく原因として、このような体内における $\gamma \delta$ T 細胞の減少が関与していることが示唆されている。また、ニワトリ、ヒツジ、ウシなどでは、末梢血中に 15~50% もの $\gamma \delta$ T 細胞が存在している。これらの動物では腫瘍の発生が少ないことから、末梢 $\gamma \delta$ T 細胞の存在がガンの抑制に大きく関与していることが示唆される。

シイタケの薬理効果

シイタケ (*Lentinus edodes*) は日本、中国の代表的な食用キノコであり、日本では約 300 年前から人工栽培が行われてきた。日常食用にしているキノコは子実体と呼ばれ、菌類が子孫を残すために胞子を生じる生殖体であり、栄養体である菌糸細胞は地中や原木中で長い時間をかけて成長する。

5 シイタケは古くからさまざまな病気や症状に効果があると言われてきたが、その薬理作用が解明されてきたのは比較的最近である。シイタケ菌糸体抽出物については、ラット、マウスでの発ガン実験において、動物の大腸、肝臓などの腫瘍形成および移植腫瘍細胞の増殖を抑制し、動物の生存率を上昇させたこと (N. Sugano et al., Cancer Letter, 27:1, 1985; 鈴木康将ら、日本大腸肛門病
10 会誌、43:178, 1990 など)、マイトジェン活性を示したこと (T. Tabata et al., Immunopharmacology, 24:57, 1992; Y. Hibino et al., Immunopharmacology, 28:77, 1994 など)、抗体産生を増強し、抗体を介する ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) による免疫学的肝細胞障害に抑制効果を示したこと (溝口靖紘ら、肝胆脾、15:127, 1987) などの種々な報告がなされている。

15 これらの知見をきっかけにシイタケの成分の薬理作用の研究が、医学薬学の分野で集中的に進められてきた。その結果、シイタケの成分の一部が、ヒトの免疫能力を回復することによりガンなどの治療に使用することができ、またガンの発病を抑制する可能性があることがわかってきた。

本発明の目的は、シイタケ菌糸体抽出物の薬理作用をさらに詳しく解明して、
20 シイタケ菌糸体抽出物の新しい医薬、食品、飲料、飼料等の用途を探索することである。

本発明は、シイタケ菌糸体抽出物を含む $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質を開発・提供し、ひいては免疫活性剤、例えば抗腫瘍剤、抗細菌感染治療剤および抗ウィルス感染治療剤を開発・提供することを目的とする。

25 本発明はまた、シイタケ菌糸体抽出物を含む $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質を使用して、もしくはシイタケ菌糸体抽出物を含む免疫活性剤を使用して、被検体の腫瘍を治療することも目的とする。

発明の開示

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、シイタケ菌糸体抽出物が $\gamma\delta T$ 細胞の活性を顕著に増強する作用を示すことを発見して、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、シイタケ菌糸体抽出物を含む $\gamma\delta T$ 細胞活性増強物質を開発・提供し、ひいては免疫活性剤、例えば、抗腫瘍剤、抗細菌感染治療剤および抗ウィルス感染治療剤を開発・提供する。

本発明はまた、シイタケ菌糸体抽出物を使用する、腫瘍、細菌感染およびウィルス感染の治療方法も開発・提供する。

本発明の $\gamma\delta T$ 細胞活性増強物質または免疫活性剤は、シイタケ菌糸体抽出物および任意成分として薬剂的に許容できる担体を含む、医薬組成物の形であってよい。

また、本発明の $\gamma\delta T$ 細胞活性増強物質または免疫活性剤は、経口投与用、注射用、経粘膜投与用、経消化管投与用または経皮投与用のいずれであってもよい。

また、本発明の $\gamma\delta T$ 細胞活性増強物質または免疫活性剤は、食品、飲料、または飼料のいずれの形であってもよい。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のシイタケ菌糸体抽出物の服用により $\gamma\delta T$ 細胞の末梢血中比率が上昇することを示す。

図2は、シイタケ菌糸体抽出物の服用前後における、 $\gamma\delta T$ 細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

図3は、本発明のシイタケ菌糸体抽出物の服用により $\alpha\beta T$ 細胞の末梢血中比率がむしろ減少することを示す対照である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の $\gamma\delta T$ 細胞活性増強に使用するシイタケ菌糸体抽出物とは、シイタケ菌を固体培地上で培養して得られる菌糸体、好ましくは菌糸体を含む固体培地を水および酵素の存在下に粉碎、分解して得られる抽出物を言う。

シイタケ菌糸体抽出物は好ましくは以下の方法により得られたものを使用する

が、これに限定されない。すなわち、バガス（サトウキビのしぼりかす）と脱脂米糠を基材とする固体培地上にシイタケ菌を接種し、次いで菌糸体を増殖して得られる菌糸体を含む固体培地を 12 メッシュ通過分が 30 重量%以下となるよう解束する。この解束された固体培地に水およびセルラーゼ、プロテアーゼまたはグルコシターゼから選ばれる酵素の 1 種またはそれ以上を、前記固体培地を 30～55℃の温度に保ちながら添加するとともに、前記固体培地を前記酵素の存在下に粉碎し、すりつぶしてバガス繊維の少なくとも 70 重量%以上が 12 メッシュ通過分であるようにする。次いで 95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させるとともに滅菌し、得られた懸濁状液を濾過することによってシイタケ菌糸体抽出物を得る。シイタケ菌糸体抽出物はそのまま本発明の $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質に用いてもよいが、これを濃縮、凍結乾燥して粉末として保存し、使用時に種々の形態で使用するのが便宜的である。凍結乾燥して得られる粉末は褐色粉末で、吸湿性があり、特異な味と臭いをもつ。

シイタケ菌糸体抽出物の *in vivo* における $\gamma \delta T$ 細胞活性増強効果を以下の実施例に記載される方法により試験したところ、顕著な $\gamma \delta T$ 細胞活性増強効果が観察された。

本発明の $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質は、 $\gamma \delta T$ 細胞により傷害される腫瘍細胞によって引き起こされる腫瘍の治療および／または予防に有効である。本発明の $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質は、特定の腫瘍細胞を特異的に治療するのではなく、 $\gamma \delta T$ 細胞の活性を高め、活性化された $\gamma \delta T$ 細胞により結果として腫瘍細胞を破壊することを目的とするという特徴を有する。すなわち、本発明の $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質を用いた治療の対象となる腫瘍細胞は、悪性腫瘍細胞だけでなく、良性腫瘍細胞であってもよく、特定の腫瘍細胞に限定されるものではない。従って、シイタケ菌糸体抽出物および任意成分として薬剤的に許容できる担体を含む $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質は、いずれかの腫瘍の治療用および／または予防用組成物として使用することができる。

本発明の $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質は、細菌感染またはウィルス感染の治療用および／または予防用組成物としても使用することができる。本発明の $\gamma \delta T$ 細胞活性増強物質は、特定の細菌またはウィルスに対して特異的に作用するのではな

く、 $\gamma\delta T$ 細胞の活性を高め、結果として感染した細菌またはウィルスを体内から排除することを目的とする。本発明の $\gamma\delta T$ 細胞活性増強物質により治療可能な細菌性またはウィルス性疾患には、たとえば結核菌 (*Mycobacterium* sp.)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、肝炎ウィルス (A 型、B 型、C 型)、ヒト免疫不全ウィルス (Human Immunodeficiency Virus)、ワクシニアウィルス (*Vaccinia virus*) などがあるが、これらに限定されない。

治療用および/または予防用組成物としての投与経路は、経口投与が最も好ましいが、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与、経鼻投与、経皮投与などであってもよい。経口投与に適した製剤には、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、溶液剤、シロップ剤などが含まれるが、これに限定されない。経鼻投与または経皮投与に適した製剤には、パップ剤、貼布剤などが含まれるが、これに限定されない。

薬剂的に許容できる担体には、当業界で公知の適当な賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着香料、着色剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などを含むが、これに限定されない。

本発明の LAK 活性増強用製剤に任意に混合可能な薬学上許容できる担体としては、当業界において公知の賦形剤 (例えば、乳糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロース等)、結合剤 (デンプン、ゼラチン、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等)、崩壊剤 (デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルスターチ等)、滑沢剤 (タルク、ステアリン酸塩等)、コーティング剤 (白糖、タルク、ゼラチン等) 等があり、さらに各種の光沢化剤、着香料、着色剤、矯味剤、溶解補助剤、安定化剤、懸濁剤、吸収促進剤等を目的に応じて加えてもよいが、これらに限定されない。また、注射剤として使用する場合には、この分野において慣用されている各種希釈剤 (例えば、水、エチルアルコール等) を使用できる。

本発明の $\gamma\delta T$ 細胞活性増強物質の投与量は被検体の年齢、体重、症状、投与経路などを考慮して医師により決定される。本発明の $\gamma\delta T$ 細胞活性増強物質に含まれるシイタケ菌糸体抽出物は元来食品として使用されてきたものであり、極めて安全であるところから、投与量を厳しく限定する必要はないが、通常シイタ

ケ菌糸体抽出物を、好ましくは1日数回(2~3回程度)、1回100 mg~10000 mg
(総投与量にして1日あたり200 mg~30000 mg)、さらに好ましくは1日3回、1
回あたり500 mg~5000 mg(総投与量にして1日あたり1500 mg~15000 mg)、さ
らに好ましくは1日3回、1回あたり1000 mg~1500 mg(総投与量にして1日あ
5 たり3000 mg~4500 mg)である。さらに、他の抗腫瘍剤と併用して投与してもよ
い。

本発明の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質は、腫瘍の治療のための養子免疫療法におい
ても使用する製剤として提供することができる。養子免疫療法とは、感作された
細胞、通常はリンパ球を生体内に移入することにより、腫瘍細胞を殺すことを目
10 的とした腫瘍の治療方法をいう。本発明の場合、まず被検体由来の末梢血中から
 $\gamma\delta$ T細胞を分離し、分離した $\gamma\delta$ T細胞をin vitroにおいて本発明の $\gamma\delta$ T細胞
活性増強物質により活性化した後、活性化された $\gamma\delta$ T細胞を再び被検体体内
に戻す。その結果、活性化された $\gamma\delta$ T細胞の作用により、体内の腫瘍細胞を破
壊することができる。

15 本発明の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質は、シイタケ菌糸体抽出物そのものであつて
もよく、あるいは、シイタケ菌糸体抽出物を含む $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質および
薬学上許容可能な担体を含む医薬または獣医薬用組成物であってもよい。

本発明の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質は、食品の形で提供することもできる。好ま
しい食品の形態としては粉末、顆粒、ペースト状、ゼリー状などが挙げられる。
20 さらに顆粒等にする場合は、甘味を加えるため、乳糖などの糖類を加えることが
望ましい。また、本発明の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質は、飲料の形で提供すること
もできる。このような食品または飲料には、シイタケ菌糸体抽出物の他に、ビタ
ミン剤、カルシウムなどの無機成分、アルコール類、ポリフェノールなどの消臭
成分などを追加してもよい。この食品または飲料には、特定保健用食品、病者用
25 食品等の範疇にあるものも含まれる。

本発明の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質は、飼料としてまたは飼料への添加剤の形で
提供することもできる。家畜の飼料としてまたは飼料への添加剤として本発明の
 $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質を使用することにより、家畜に発生する腫瘍を治療およ
び/または予防し、あるいは家畜に対する細菌またはウィルス性の感染症を治療

および／または予防することができる。その結果、家畜について現在使用されている治療薬、たとえば抗生物質などの使用量を減少することができ、それに伴って飼育コストを低下することができる。さらに、抗生物質を投与したために生産物を出荷できない期間をより短くすることができるというさらなる効果もある。

- 5 ヒト被検体における、*in vivo* での $\gamma \delta T$ 細胞活性増強効果試験法は以下の通り行った。まずヒト被検者にシイタケ菌糸体抽出物原末 3.6 g を 7 日間にわたり毎日接種させた（全量 25.2 g）。次いでシイタケ菌糸体抽出物服用後の末梢血中 $\gamma \delta T$ 細胞頻度を、服用前の当該細胞頻度との比較においてフローサイトメトリーを用いて測定した。
- 10 本発明を以下の実施例によりさらに詳しく説明するが、これにより本発明の範囲を限定するものではない。本発明の方法を種々変更、修飾して使用することが当業者には可能であり、これらも本発明の範囲に含まれる。

実施例

15 実施例 1：シイタケ菌糸体抽出物の調製法

- バガス 90 重量部、米糠 10 重量部からなる固体培地に純水を適度に含ませた後に、シイタケ種菌を接種し、温度および湿度を調節した培養室内に放置し、菌糸体を増殖させた。菌糸体が固体培地に蔓延した後、バガス基材の繊維素を解束し、12 メッシュ通過分が 24 重量％以下となるようにした。この解束された培地 1.0 kg
- 20 に、純水 3.5 L および精製セルラーゼ 2.0 g を固体培地を 40℃ に保ちながら加えて培地含有混合物とした。

- 次いで培地含有混合物を変速付ギヤーポンプにより循環させながら、固体培地にギヤー部分において粉碎およびすりつぶし作用を 200 分間程度加え、バガス繊維の約 80 重量％が 12 メッシュ通過分となるようにした。培地含有混合物の粉碎
- 25 およびすりつぶしは、該混合物の温度を徐々に上昇させながら行った。その後培地含有混合物をさらに加熱して、90℃として 30 分間放置した。90℃への加熱により、酵素を失活せしめ、かつ殺菌を施した。得られた培地含有混合液を 60 メッシュ濾布を用いて濾過してシイタケ菌糸体抽出液を得た。これを濃縮した後、凍結乾燥し、シイタケ菌糸体抽出物原末を得た。

このようにして得られるシイタケ菌糸体抽出物はフェノール硫酸法による糖質分析により糖質を 25.3% (w/w)、Lowry 法によるタンパク質分析によりタンパク質を 19.7% (w/w)、没食子酸を標準とする Folon-Denis 法によりポリフェノールを 2.6% (w/w) 含んでいた。シイタケ菌糸体抽出物にはそのほかに粗脂肪 8%、

5 粗灰分 22%、糖質以外の可溶性無窒素物を約 20% 含む。

また、シイタケ菌糸体抽出物の構成糖組成 (%) は以下の通りであった：Xyl : 15.2 ; Ara : 8.2 ; Man : 8.4 ; Gul : 39.4 ; Gal : 5.4 ; GlcN : 12.0 ; GLuUA : 11.3。

実施例 2 : シイタケ菌糸体抽出物の $\gamma\delta$ T 細胞活性増強 in vivo 試験

10 ヒト被検者 3 名 (被験者 A~C) にシイタケ菌糸体抽出物原末 3.6 g/日を 7 日間 にわたり毎日経口的に服用させた (全量 25.2 g)。シイタケ菌糸体抽出物服用 期間経過後、ヒト被検者から末梢血を採取した。服用後に採取した末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞頻度を、服用前に採取した末梢血中の細胞頻度と比較して、フローサイ トメトリーにより測定した。得られた結果を図 1 および図 2 に示す。

15 3 名全員とも、シイタケ菌糸体抽出物の服用前と比較して、服用後には末梢血 中の $\gamma\delta$ T 細胞の比率が、平均して 40% 以上上昇した。

表 1 : 服用前後における、末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞比率の増加率

| | 被検者 A | 被検者 B | 被検者 C | 平均 \pm SEM |
|-----|---------|---------|---------|---------------------|
| 増加率 | 124.39% | 146.15% | 150.00% | 140.18% \pm 7.97% |

一方、同一の被検者から採取した服用前後の末梢血液について、 $\gamma\delta$ T 細胞以
20 外のマーカーについて調べた。その結果、シイタケ菌糸体抽出物には $\alpha\beta$ T 細胞 に対する増殖活性は見られず、平均すると細胞比率の減少が見られた (図 3)。

産業上の利用可能性

本発明のシイタケ菌糸体抽出物を含む $\gamma\delta$ T 細胞活性増強物質は、実際に $\gamma\delta$ T
25 細胞を活性化することができることがわかった。このことから、本発明の $\gamma\delta$ T 細胞活性増強物質は、 $\gamma\delta$ T 細胞の有する腫瘍細胞傷害活性、抗細菌感染および

抗ウイルス感染作用を誘導することにより、生体を腫瘍、細菌感染およびウイルス感染から防御する効果を有しており、腫瘍、細菌感染およびウイルス感染の予防、治療に使用できる。また、 $\gamma\delta$ T細胞のにより、本発明の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質は、副作用がないことから、安全に使用でき、大きな産業上の利用可能性が期待できる。

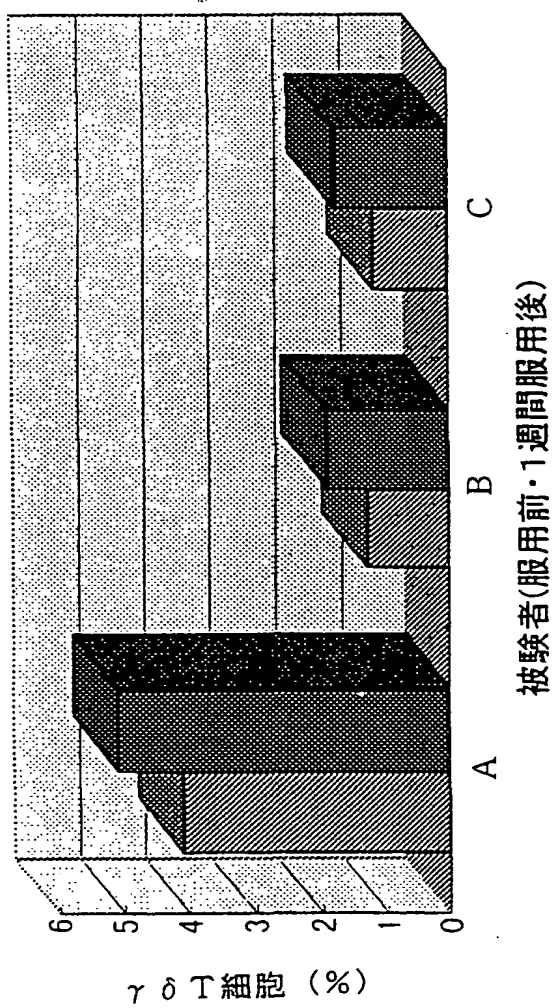
また、細菌感染および／またはウイルス感染を引き起こした家畜について使用する場合にも、現在使用されている治療薬、たとえば抗生物質などの使用量を減少することができ、それに伴って飼育コストを低下することができる。さらに、抗生物質を使用しないため、生産物を出荷することができない期間をより短くすることができるというさらなる効果もある。

請求の範囲

1. シイタケ菌糸体抽出物を含む、 $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
2. シイタケ菌糸体抽出物、および薬剂的に許容できる担体を含む、医薬ま
- 5 たは獣医薬用の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
 3. 経口投与用である、請求項1または2の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
 4. 食品である、請求項1の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
 5. 飲料である、請求項1の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
 6. 飼料である、請求項1の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
- 10 7. 注射用または経皮吸収用である、請求項1または2の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
 8. 被検体から採取した $\gamma\delta$ T細胞を *in vitro* において活性化するための、請求項1の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
 9. 腫瘍の治療に用いる、請求項1～8のいずれか1項の $\gamma\delta$ T細胞活性増
 - 15 強物質。
 10. 細菌感染またはウィルス感染の予防または治療に用いる、請求項1～8のいずれか1項の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質。
 11. 請求項9に記載の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質を生体に投与することによる、被検体の腫瘍の治療方法。
 - 20 12. 請求項10に記載の $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質を生体に投与することによる、被検体の細菌感染またはウィルス感染の予防または治療方法。
 13. $\gamma\delta$ T細胞活性増強物質の製造のための、シイタケ菌糸体抽出物の使用。

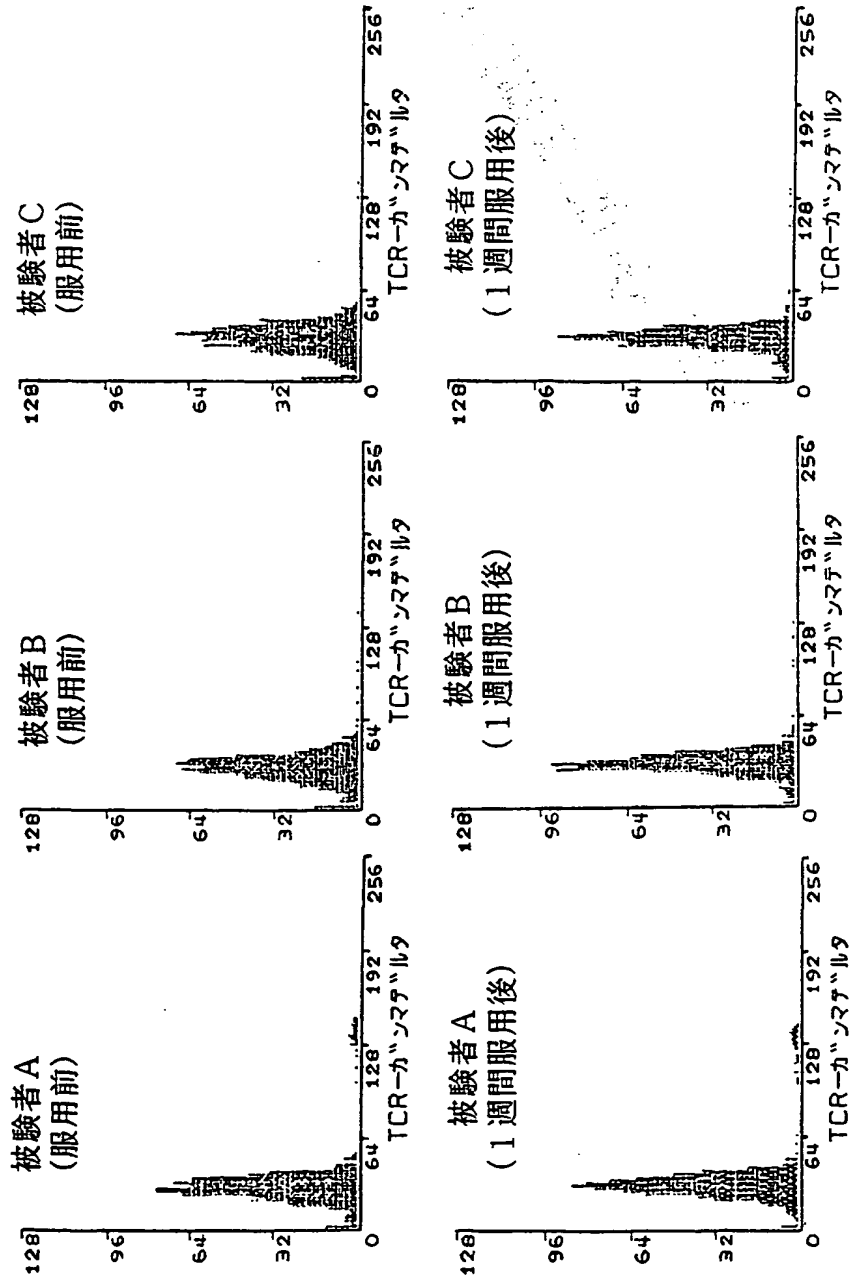
This Page Blank (uspto)

図 1



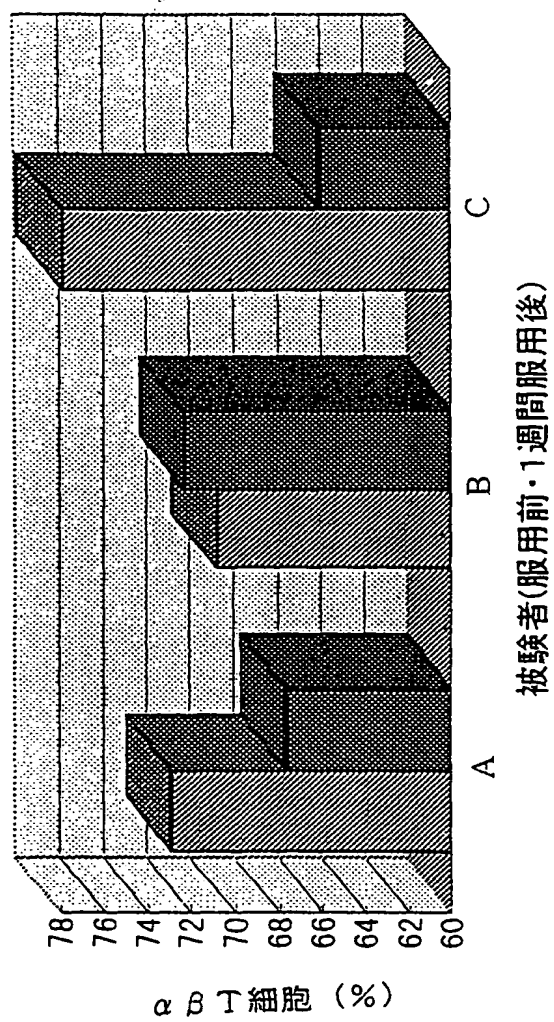
This Page Blank (uspto)

図 2



This Page Blank (uspto)

図 3



This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/84, A61P31/00, A61P35/00, A23L1/28
A23K1/16//A23L1/212

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/84, A61P31/00, A61P35/00, A23L1/28
A23K1/16//A23L1/212

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO, 9525745, A1 (MISEVIC Gradimir), 28 September, 1995 (28.09.95) & EP, 751958, A1 | 1-10, 12 13 |
| A | IMMUNOLOGY LETTERS, vol.32, no.3, p265-272, 1992 "The amplifier role of T cells in the human in vitro B cell response to type 4 pneumococcal polysaccharide" Arjan W. Griffioen et al, See summary | 1-10, 12 13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 February, 2000 (07.02.00)

Date of mailing of the international search report
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06617

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11,12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claims 11 and 12 relates to a method for treatment of the human body by therapy.
(PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

| | | |
|--|---|--|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁷ A61K35/84, A61P31/00, A61P35/00, A23L1/28 A23K1/16//A23L1/212 | | |
| B. 調査を行った分野 | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁷ A61K35/84, A61P31/00, A61P35/00, A23L1/28 A23K1/16//A23L1/212 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | |
| CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG) | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | WO, 9525745, A1 (MISEVIC Gradimir) 28. 9月. 1995 (28. 09. 95) & EP, 751958, A1 | 1-10, 13 |
| A | IMMUNOLOGY LETTERS, vol. 32, no. 3, p265-272, 1992 "The amplifier role of T cells in the human in vitro B cell response to type 4 pneumococcal polysaccharide" Arjan W. Griffioen et al summary 参照 | 1-10, 13 |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 07. 02. 00 | | 国際調査報告の発送日 22.02.00 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 鶴見 秀紀 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11, 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

治療による人体の処置方法に関するものである。（PCT規則39.1(iv)）

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。